

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-145701
(P2002-145701A)

(43) 公開日 平成14年5月22日 (2002.5.22)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 0 1 N 1/02		A 0 1 N 1/02	4 C 0 9 7
A 6 1 F 2/10		A 6 1 F 2/10	4 H 0 1 1

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願2000-337025(P2000-337025)

(22) 出願日 平成12年11月6日 (2000.11.6)

(71) 出願人 500426940
株式会社チャールストン・メディケア
東京都千代田区神田鍛冶町三丁目6番地7
ウンピン神田ビル5F

(71) 出願人 500510696
▲かけ▼山 昌彦
東京都杉並区和泉4-18-28

(71) 出願人 500179611
倉田 莊太郎
大分県大分市萌葱台11-6

(74) 代理人 100093470
弁理士 小田 富士雄 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 毛包の凍結保存法、凍結保存した毛包、凍結毛包の溶解法及び溶解した毛包並びにこの毛包の移植法

(57) 【要約】

【課題】 採取した毛包組織を単一又は所定の単位ごとに分離し凍結保存する方法を提供する。

【解決手段】 採取した毛包組織を基礎溶液で洗浄し、この毛包組織を単一ないし所定単位に分離する。次いで、凍結保護剤を添加した基礎溶液を貯蔵した容器内に、この分離した毛包を装填し、更にこの容器を所定の冷却速度パターンで冷却する。そして所定の冷却温度に達した後にこの容器を液体窒素で凍結する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 採取した毛包組織を基礎溶液で洗浄する工程と、該毛包組織を単一ないし所定単位に分離する工程と、凍結保護剤を添加した基礎溶液を貯蔵した容器に該分離した毛包を装填する工程と、該容器を所定の冷却速度パターンで冷却する工程と、所定の冷却温度に達した後に該容器を液体窒素で凍結する工程とからなることを特徴とする毛包の凍結保存法。

【請求項 2】 基礎溶液は、DMEM、RPMI 1640、Williams E mediumもしくはHanks' solutionの何れかであって、この何れかの基礎溶液に細胞浸透性凍結保護剤及び非細胞浸透性凍結保護剤を添加することを特徴とする請求項 1 記載の毛包の凍結保存法。

【請求項 3】 細胞浸透性凍結保護剤にグリセロール、ジメチルスルフォキシドのいずれか、また非細胞浸透性凍結保護剤にポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、デキストラン、プロピレングリコール、グルコース、トレハロース、アセトアミドのいずれかを用いることを特徴とする請求項 2 記載の毛包の凍結保存法。

【請求項 4】 細胞浸透性凍結保護剤にグリセロール、ジメチルスルフォキシドのいずれかを 10%、また非細胞浸透性凍結保護剤にポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、デキストラン、プロピレングリコール、グルコース、トレハロース、アセトアミドのいずれかを 5% を添加することを特徴とする請求項 3 記載の毛包の凍結保存法。

【請求項 5】 容器の冷却速度パターンは、常温から 0℃までは冷却速度 0.5℃/分から 2.5℃/分の範囲で冷却し、その後 0℃からマイナス 80℃までは冷却速度 0.2℃/分から 2℃/分の範囲で冷却し、マイナス 80℃以下に下がった段階で該容器を液体窒素で冷却凍結することを特徴とする請求項 1 ないし 4 記載の何れかの毛包の凍結方法。

【請求項 6】 請求項 1 ないし 5 記載の何れかの毛包凍結法で凍結した毛包。

【請求項 7】 凍結毛包を装填した容器を液体窒素タンクから取り出す工程と、該取り出した容器を所定温度の湯水に浸し溶解する工程と、溶解した毛包を室温にて基礎溶液で洗浄し凍結保護剤を除去する工程と、該洗浄された毛包を所定温度に保持する工程とからなることを特徴とする凍結毛包の溶解法。

【請求項 8】 冷凍保存容器を所定温度の湯水で加温し、37℃或いはそれ以下の温度で毛包を溶解することを特徴とする請求項 7 記載の凍結毛包の溶解法。

【請求項 9】 請求項 7 又は請求項 8 に記載された凍結毛包の溶解法で溶解された毛包。

【請求項 10】 請求項 9 記載の溶解された毛包を採取した本人の頭部の脱毛部位に移植することを特徴とする植毛法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、毛包の凍結保存法、特に採取した毛包組織を単一又は所定単位ごとに分離し凍結保存する方法に係り、凍結した毛包、更に溶解した毛包並びにこの毛包を用いた植毛法に関する。

【0002】

【従来の技術】これまで脱毛症に対する治療法として、有効成分を含む育毛剤、養毛剤或いは発毛剤による外用療法、或いは内服治療及び物理的な刺激等による残存毛包刺激によって毛の再生を促す方法、更には人工物若しくは本人の他部位の毛髪を毛包ごとに移植する方法が知られている。

【0003】これらの治療法のうち、とりわけ育毛剤、養毛剤或いは発毛剤を用いた外用剤による外用療法が最も一般的であって、中でも男性型脱毛症に対する外用剤はその種類が多く、比較的簡単に入手できることもあって、多くの脱毛症患者に使用されて来ている。しかしながら、これらの外用剤を使用した治療法は、決して満足のいく効果が得られるとは限らず、より効果的な治療法の開発が求められていた。

【0004】一方、人工毛の移植、いわゆるカツラによる脱毛部分の被覆は、広告による知名度の高さと即座に効果が得られる点から多くの脱毛症患者に使用されているが、自毛ではないという点で満足感が得られない場合もあり、すべての患者に受け入れられているとは言いがたかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】これらの点を考慮すると、残存する部分からの自毛移植は患者にとって、自分の毛髪を再生している実感があり、精神的な満足感を患者に与えることができる。しかしながら、大量の毛包組織を単一もしくは所定単位に分離するには長い時間が掛かり、患者はその間、病院等の施設内に長時間待機していなければならなかった。また一度に移植できる毛包の量は限られており、通常満足のいく状態にまで自毛移植を行うには、数回の手術が必要であった。更に移植手術の際に、その度ごとに毛包組織の採取が必要となり、毛包組織を分離する時間や術後、採取部分の創傷手当等煩雑さは患者にとって大きなストレスとなっていた。

【0006】上記の課題を解決するために、発明者らは、一回の毛包組織採取で複数回の自毛移植ができないものかを誠意研究した。その結果、一度に大量の毛包組織を採取し、これを単一もしくは所定単位に分割し、液体窒素を用いてこれらの毛包を凍結保存する方法を開発した。

【0007】もっとも、これまで毛包でなく培養上皮細胞シートの凍結保存法は知られている（例えば、特開平 9-110601）。この凍結保存法では、培養表皮は表皮角化細胞を型どおりに培養し、これをシート状にして凍結保存する方法であって、ここで用いているのは一

種類の細胞で創面を被うことを目的に保存するものである。これに対して、本発明で扱う毛包は、いくつもの種類からなる複雑な器官であり、これを凍結保存することは、培養細胞や単一の細胞からなるシートを凍結保存することと大きく異なり、この凍結した毛包は解凍後も正常な毛を産生し続ける機能を維持していることである。それ故、本発明は、毛包と言う小さな臓器をその機能を温存したままで凍結保存することに成功したものである。

【0008】そこで本発明は、採取した毛包組織を単一又は所定の単位ごとに分離し凍結保存する方法を提供することにある。

【0009】本発明はまた、採取した毛包組織を単一又は所定単位ごとに分離し凍結した毛包を得ることを目的とする。

【0010】本発明は更に、凍結保存した毛包を溶解する方法を提供することにある。

【0011】本発明は更にまた、溶解した毛包を得ることを目的とする。

【0012】本発明は更にまた、溶解した毛包を用い植毛する方法を提供することにある。

【0013】上記の目的は、以下の手段によって達成することができる。

【0014】

【課題を解決するための手段】請求項1の発明は、採取した毛包組織を基礎溶液で洗浄する工程と、該毛包組織を単一ないし所定単位に分離する工程と、凍結保護剤を添加した基礎溶液を貯蔵した容器に該分離した毛包を挿入する工程と、該容器を所定の冷却速度パターンで冷却する工程と、所定の冷却温度に達した後に該容器を液体窒素で凍結する工程とからなることを特徴とする。

【0015】請求項2の発明は、請求項1記載の基礎溶液は、DMEM、RPMI 1640、Williams EmediumもしくはHanks' solutionの何れかであって、この何れかの基礎溶液に細胞浸透性凍結保護剤及び非細胞浸透性凍結保護剤を添加することを特徴とする。

【0016】請求項3の発明は、請求項2記載の基礎溶液に、細胞浸透性凍結保護剤としてグリセロール、ジメチルスルフォキシドのいずれか、及び非細胞浸透性凍結保護剤としてポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、デキストラン、プロピレングリコール、グルコース、トレハロース、アセトアミドのいずれかを添加することを特徴とする。

【0017】請求項4の発明は、細胞浸透性凍結保護剤にグリセロール、ジメチルスルフォキシドのいずれかを10%、また非細胞浸透性凍結保護剤にポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、デキストラン、プロピレングリコール、グルコース、トレハロース、アセトアミドのいずれかを5%を添加することを特徴とする。

【0018】請求項5の発明は、請求項1ないし4記載の容器の冷却速度パターンは、常温から0℃までは冷却速度0.5℃/分から2.5℃/分の範囲で冷却し、その後0℃からマイナス80℃までは冷却速度0.2℃/分から2℃/分の範囲で冷却し、マイナス80℃以下に下がった段階で該容器を液体窒素で冷却凍結することを特徴とする。

【0019】請求項6の発明は、請求項1ないし4記載の何れかの毛包凍結法で凍結した毛包を特徴とする。

【0020】請求項7の発明は、凍結毛包を収納した凍結保存容器を液体窒素タンクから取り出す工程と、該取り出した冷凍保存容器を所定温度の湯に浸し溶解する工程と、溶解した毛包を室温にて基礎溶液で洗浄し凍結保護剤を除去する工程と、該洗浄された毛包を所定温度に保持する工程とからなることを特徴とする。

【0021】請求項8の発明は、冷凍保存容器を所定温度の湯水で加温し、37℃或いはそれ以下の温度で毛包を溶解することを特徴とする。

【0022】請求項9の発明は、請求項7又は請求項8に記載された凍結毛包の溶解法で溶解された毛包を特徴とする。

【0023】請求項10の発明は、請求項9記載の溶解された毛包を採取した本人の頭部の脱毛部位に移植することを特徴とする植毛法。

【0024】この方法を用いれば初回手術時に必要なだけの自毛移植を行い、過剰に採取した毛包は液体窒素タンクに保管することで、ほぼ半永久的に細胞が死滅することなく保存できる。またこの凍結保存された毛包は所定温度で融解することで、新たに採取した毛包と同様に移植が可能であり、移植後の生着率も高く通常の毛周期をくり返すことが実証された。

【0025】次に患者の都合の良い時期（数カ月後でも数年後でも良い）に凍結保存毛包より所定本数を希望の部位に移植することができる。この時の手術は毛包を移植する個所だけに局所麻酔を行えば良く、また予め毛包は、単一もしくは毛包単位に分離してあるため極めて短時間で終了することができる。さらに凍結毛包は残りの分を保存されており、これも患者の希望により数回に分け患者の生涯に渡って移植利用することができる。

【0026】

【発明の実施の形態】以下、実施例及び実験例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

【0027】本発明者らは、一回の毛包採取で複数回の自毛移植ができないものかを検討した。その結果一度に大量の毛包組織を採取しこれを単一もしくは毛包単位に分割し、液体窒素を用いてこれらの毛包を保存する方法を完成した。

【0028】この方法を用いれば初回の手術時に必要なだけの自毛移植を行い、過剰に採取した毛包は液体窒素

タンクに保管することによって、ほぼ半永久的に細胞が死滅することなく保存できる。またこの凍結保存された毛包は、所定温度、例えば 37℃ で溶解することで、新たに採取した毛包と同様に患者への移植が可能であり、移植後の生着率も高く通常の毛周期をくり返すことができることを突き止めた。

【0029】先ず初回の手術において、患者から所定本数の毛包、例えば 3000 本の毛包を採取し、初回時に、例えば 1000 本の毛包を患者に移植し、残りの 2000 本を液体窒素にて凍結保存する。次いで患者の都合の良い時期、例えば数カ月後或いは数年後に凍結保存毛包から、必要な本数、例えば 500 本を溶解し、所定の部位に移植する。この時の手術は、毛包を移植する個所だけに局所麻酔で行うことができ、また予め毛包は単一或いは所定単位に分離してあるため極めて短時間で終了することができる。更に毛包は、残り 1500 本が凍結保存されていることから、これも患者の希望に合わせて、複数回に分け患者の生涯に亘って移植することができる。

【0030】以下、毛包の凍結保存法、凍結毛包の溶解法、毛包の移植法及び毛包の輸送法等を順次説明する。

【0031】毛包の凍結保存法；患者の健全な毛包が存在する部位から所定量の毛包組織の採取を行う。その際、採取部位は一時的に縫縮するので、その大きさには個人差はあるが、原則として一時的に縫縮可能なサイズと言うことになる。患者の後頭部から毛包を採取する際、所定の面積、例えば 1.5 cm × 1.5 cm の頭皮を採取すると約 3000 本以上の毛包を得ることができる。

【0032】次いで、採取した帯状の毛包組織を約 4℃ の生理食塩水と基礎溶液でよく洗浄し、血液を除去する。その後、4℃ の温度を維持し、毛包組織を傷つけないように注意しながら、所定の毛包単位或いは単一の毛包に分離する。その際、患者の希望があれば当日移植も可能であるので、その分はただちに移植手術を行う。残りの毛包は凍結保護剤を添加した基礎溶液に移し、よく浸透させる。

【0033】この基礎溶液は DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), RPMI 1640, Williams E 或いは Hank's solution が適当である。このいずれかの基礎溶液に細胞浸透性凍結保護剤として 10% グリセロール及び非細胞浸透性凍結保護剤として 5% ポリエチレングリコールを添加する（濃度はそれぞれ添加後最終濃度で表している）。また、細胞浸透性凍結保護剤としてグリセロールのほかにはジメチルスルホキシド、また非細胞浸透性凍結保護剤としてポリエチレングリコールのほかにはポリビニルピロリドン、デキストラン、プロピレングリコール、グルコース、トレハロース、アセトアミドを使用することができる。

【0034】この毛包は溶解後の使用に便利のように、例えば 20 本から 100 本程度にわけて容器に入れる。

そして常温で 20 分程度静置した後、以下の速度で冷却する。常温から 0℃ までは 1 分間に 0.5℃ から 2.5℃ の温度範囲で冷却し、その後は、1 分間に 0.2℃ から 2℃ の温度範囲でゆっくり冷却し続け、マイナス 80℃ より低くなったところで液体窒素タンク内に素早く移管する。

【0035】この作業は市販のプログラムセルフフリーザー（クリモンド社製 No. 1010/2700）のような冷却比率調整冷却装置によっても行うことができる。保存期間中は液体窒素が蒸発するため液量減少により保存容器は空気と触れ温度が上昇しないように管理することが重要である。

【0036】保存毛包の溶解法；必要本数の毛包を入れた凍結保存容器を液体窒素タンクから取り出し、37℃ に温めた湯水中で溶解する。なお、湯水温度は、37℃ に限定されず、0℃ から 100℃ の範囲でもよいが、ここで重要なことは、溶解後の温度は 37℃ 以上にしないことである。この温度を超える温度で毛包が放置されると蛋白変性を起こし組織に障害が発生する恐れがあるからである。そして、保存容器が室温程度まで達したところで溶解した毛包は、数回基礎溶液を入れ替えて洗浄し、凍結保存液を除去する。この段階から毛包は 4℃ に保ち、移植作業中にも長時間室温に放置しないようにする。

【0037】毛包の移植；患者の移植部位に十分な麻酔剤（10 万倍エピネフリンを含有した 1% キシロカインが一般的である）を注射し局所麻酔をする。次いで、植毛用メス、マイクロメス、植毛針等を用いて頭皮に予定した数だけ移植床を作成する。これらの移植床にあらかじめ準備した溶解後の毛包を注意深く挿入し、出血がないことを確認して手術を終える。

【0038】毛包の輸送；凍結保存の前に採取した毛包を輸送する必要がある場合、或いは凍結保存後に溶解してから他の場所に輸送する必要がある場合は、毛包を十分な量の基礎溶液に浸し、4℃ に保持して移動することが望ましい。この際、24 時間以内に目的地に到着できるようにする。室温や 37℃ で長時間放置すると毛包細胞のダメージが進み移植時の生着率が低下するので 4℃ の温度に保持する。また凍結したままで輸送する場合にはドライアイスに封入して輸送する。この場合には 24 時間程度であれば毛包のダメージを最小限に抑えることができる。

【0039】ヌードマウスへの移植実験の結果；ポランディアより採取した人間の毛包を上記の凍結方法で 1 カ月間液体窒素タンク内に保存した。その後、上記の溶解方法で溶解し、ヌードマウスの肉様膜下に移植した。移植時の毛包は約 4mm で組織学的にも正常であった。移植後 8 ヶ月に取り出したところ、毛包は約 5.5mm に成長し、結局 5.1mm 増となった。新鮮毛包とは採取した毛包を凍結せずにそのまま移植を行ったことを言う。凍結毛

包とは採取した毛包をいったん液体窒素にて保存し、再溶解して移植を行ったものをいう。

*【0040】

*【表1】

	生着率	
新鮮毛包	15/20本	75%
凍結毛包	14/20本	70%

【0041】新鮮毛包と凍結毛包をヌードマウスに移植した結果、上記の表1に示した如くそれぞれ75%と70%であり、ヌードマウスでの生着率が元来あまり高くはないことを考慮するとほぼ同等の結果と言える。

【0042】人への移植結果；患者から採取した単一毛包を上記の凍結方法で3カ月間液体窒素タンクに保存した。その後、上記の溶解方法で溶解し、患者本人の頭頂部へ移植した。その結果約5カ月後から発毛が見られ成長速度は新鮮毛と同等であった。

【0043】

【発明の効果】この方法によれば、初回手術時に必要なだけの自毛移植を行い、過剰に採取した毛包は液体窒素タンクに保管することで、ほぼ半永久的に細胞が死滅す

ることなく保存できる。またこの凍結保存された毛包は所定温度で融解することで、新たに採取した毛包と同様に移植が可能であり、移植後の生着率も高く通常の毛周期をくり返すことができる。

【0044】次に患者の都合の良い時期（数カ月後でも数年後でも良い）に凍結保存毛包より所定本数を希望の部位に移植することができる。この時の手術は毛包を移植する箇所だけに局所麻酔を行えば良く、また予め毛包は、単一もしくは毛包単位に分離してあるため極めて短時間で終了することができる。さらに凍結毛包は残りの分を保存されており、これも患者の希望により数回に分け患者の生涯に渡って移植利用することができる。

フロントページの続き

(71) 出願人 597053670

江崎 哲雄

東京都世田谷区用賀1丁目7番21号

(72) 発明者 倉田 荘太郎

大分県大分市萌葱台11-6

(72) 発明者 江崎 哲雄

東京都世田谷区用賀1-7-21

Fターム(参考) 4C097 AA22

4H011 BB03 BB06 BB07 BB08 BB19

CA05 CB04 CD02 CD06 DH02

DH08 DH10